昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, June 2011, 54(6): 664 – 674 ISSN 0454-6296

基于 16S rDNA 序列的柑桔木虱体内共生菌多样性研究

殷幼平[1]，刘婷婷[1]，田圣超[1]，胡修峰[1]，吴　东[2]，王中康[1,*]
(1. 重庆大学生物工程学院，重庆市基因功能与调控重点实验室，重庆 400030；
2. 亚洲果业广西利添生物科技发展(合浦)有限公司，广西北海 536128)

摘要：昆虫消化道内是一个复杂的微生态系统，有大量的微生物存在。这些微生物对寄主发育、营养吸收和防御方面都起着重要的作用。本文利用基于 16S rRNA 基因的 PCR-RFLP 指纹图谱法和变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis，DGGE)的方法对柑桔黄龙病虫-媒柑桔木虱 *Diaphorina citri* 体内细菌菌群多样性进行了研究。经 PCR-RFLP 分析显示 31 条序列与变形菌门的假单胞菌科、肠杆菌科、黄单胞菌科、伯克氏菌科、立克次氏菌科和根瘤菌科细菌具有较高同源性。柑桔木虱内共生细菌的优势菌群依次为合胞体共生菌(syncytium endosymbiont)(同源性 99%，5 条序列，分离频率 31%)、*Candidatus* Carsonella ruddii 和 *Mycetocyte* 内共生菌(同源性 98%，5 条序列，分离频率 31%)以及亚洲韧皮杆菌(*Candidatus* Liberibacter asiaticus)和内共生菌 *Wolbachia*。对柑桔木虱内生细菌 16S rDNA V3 区序列的 PCR-DGGE 分析，条带相似性的 UPMAGA 聚类分析表明，采自九里香 *Murraya paniculata* 的柑桔木虱内生细菌大多聚为一支，而来自柑桔的聚在另一支，说明寄主差异对柑桔木虱内生细菌菌群构成的影响大于地理位置的影响。将 PCR-DGGE 条带测序，序列经 GenBank 序列比对发现柑桔木虱内生细菌主要属于变形菌门假单胞菌科、立克次氏菌科、肠杆菌科、黄单胞菌科以及厚壁菌门链球菌科和芽孢杆菌科。合胞体共生菌(条带 3-4)因其稳定存在于木虱体内且不随柑桔木虱寄主和地理位置的改变而变化，可能是柑桔木虱体内的优势共生菌；内共生细菌 *Wolbachia* 也在柑桔木虱内稳定存在，表明我国柑桔木虱感染 *Wolbachia* 是普遍现象。PCR-RFLP 和 PCR-DGGE 两种方法相结合较好地反映了柑桔木虱内生细菌菌群的多样性，而且均显示出柑桔木虱内的合胞体共生菌是主要的优势菌群。

关键词：柑桔木虱；共生菌；16S rDNA；细菌菌群多样性；变性梯度凝胶电泳(DGGE)；RFLP 分析
中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2011)06-0664-11

Microbial diversity in *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) estimated by 16S rDNA analysis using DGGE and RFLP

YIN You-Ping[1], LIU Ting-Ting[1], TIAN Sheng-Chao[1], HU Xiu-Feng[1], WU Dong[2], WANG Zhong-Kang[1,*] (1. Key Lab of Genetic Function and Regulation in Chongqing, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China; 2. Lucky Team Biotech Development (Hepu) Co. Ltd., Beihai, Guangxi 536128, China)

Abstract: The internal gut of insects is a complex micro-ecosystem, in which inhabits a large and varied microbial community. This microbial community plays an important role for their hosts' growth, development, digestion and absorption of nutrition, colonization resistance against invasion of exotic microbes. In this paper, the diversity of bacterial flora of citrus psyllids (*Diaphorina citri*), which is a vector of the Huanglongbing pathogen *Candidatus* Liberibacter asiaticus, was investigated based on analysis of 16S rDNA sequences by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The PCR-RFLP result showed that 31 sequences share high homology with Proteobacteria, including Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Xanthomonadaceae, Burkholderiaceae, Rickettsiaceae and Rhizobiaceae. The dominant bacterial flora in *D. citri* included syncytium endosymbiont (5 sequences, homology 99%, isolating frequency 31%), *Mycetocyte* endosymbiont and *Candidatus* Carsonella ruddii (5 sequences, homology 98% and isolating frequency 31%), *Candidatus* Liberibacter asiaticus and *Wolbachia*. The analysis of 16S rDNA V3 region

基金项目：国家自然科学基金项目(309771875)；校企合作科研课题(200706-201312)
作者简介：殷幼平，女，1955 年生，重庆长寿人，博士，教授，主要从事昆虫学及昆虫与微生物互作相关研究，E-mail：ypy128@sina.com
* 通讯作者 Corresponding author，E-mail：zkwang646@sina.com
收稿日期 Received：2010-02-01；接受日期 Accepted：2011-05-14

sequencing by PCR-DGGE revealed that the inner bacteria of *D. citri* collected from *Murraya paniculata* were clustered in one branch and those from citrus were clustered in another branch, suggesting that the host plant has more obvious impact on the bacteria flora of *D. citri* than the geographic location. The sequencing of the isolated bands of DGGE and GenBank alignment showed that the bacteria of *D. citri* mainly belong to Proteobacteria and Firmicutes, including Pseudomonadaceae, Rickettsiaceae, Enterobacteriaceae, Xanthomonadaceae, Streptococcaceae and Bacillaceae. Syncytium endosymbiont (band 3-4) may be predominating population because it can be stably isolated from *D. citri* no matter what the host plant is and where the geographic location. The high isolation rate of *Wolbachia* inside of citrus psyllids revealed that *D. citri* being infected with *Wolbachia* is a common phenomenon in China. Both PCR-RFLP and DGGE analysis indicated that the syncytium endosymbiont of *D. citri* is a dominant bacterial flora and the two methods in combination can reveal the microbial diversity in *D. citri* conveniently.

Key words: *Diaphorina citri*; endosymbiont bacteria; 16S rDNA; microbial diversity; PCR-DGGE; RFLP

昆虫体内栖息着大量的原核细菌，它们主要分布在肠道和体液中，在一些器官内还存在胞内共生菌，它们对寄主产生重要影响。已有研究发现，细菌和昆虫寄主之间除了少数属于病原菌与寄主的关系外，还存在着广泛的非致病关系，甚至有的细菌是昆虫寄主生长繁殖所必需的(Dillon *et al*., 2002; Brummel *et al*., 2004; 刘莉等, 2008)。昆虫肠道内的有益共生细菌在食物的消化、营养的吸收、繁殖(Campbell, 1989; Tokuda *et al*., 1997; Dillon and Charnley, 2002; Yin *et al*., 2011)及信息素的合成(Dillon *et al*., 2002)中都起着重要作用，同时这些共生微生物在抵御外来细菌的入侵、定殖和加强免疫系统的功能中也起着重要作用；而一些存在于昆虫各器官内的胞内共生菌与许多氨基酸等营养物质的合成有关，可以弥补寄主昆虫食物中营养的不足，如蚜虫血腔中含菌细胞(*Mycetocyte* 或 bacteriocytes)中的共生菌 *Buchnera*，其主要功能是为宿主蚜虫提供多种必需氨基酸(Baumann *et al*., 1995; Birkle *et al*., 2002; Douglas, 2006)。近年来一些研究发现某些共生菌与昆虫的生物学特性相关，如内共生菌 *Wolbachia* 能够影响昆虫宿主的生殖作用。昆虫体内的细菌还与昆虫存在协同进化关系，因此研究昆虫体内共生菌也是研究昆虫的进化和昆虫生理的有利工具。

同翅目昆虫(包括蚜虫、粉虱、介壳虫、木虱和蝉)主要以植物汁液为食。已有研究表明同翅目昆虫的内共生菌参与了宿主的新陈代谢作用，如一些必需营养素的合成和含氮废物的利用(Douglas, 1989; Baumann *et al*., 1995; Sasaki *et al*., 1996; Dixon, 1998)。柑桔木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 属于同翅目木虱科，主要危害九里香 *Murraya paniculata* 和柑桔等芸香科植物，在其体内也可能存在大量共生微生物为其合成和提供必需的营养。同时由于柑桔木虱是重要植物病害-柑桔黄龙病菌的传播媒介，其体内的共生微生物区系及多样性还可能对病原菌在木虱体内的转移和增殖产生影响。

关于柑桔木虱体内细菌群落的研究还较少，本研究的目的就是利用分子生物学手段检测携带柑桔黄龙病菌的自然种群柑桔木虱体内细菌群落。利用真细菌(Eubacteria) 16S rRNA 基因(16S rDNA)限制片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析方法和 16S rRNA 基因的 DGGE 分离分析法，检测分析携带柑桔黄龙病菌的自然种群柑桔木虱体内细菌群落及多样性，为研究柑桔木虱体内共生细菌与黄龙病菌之间的关系奠定基础。

1　材料和方法

1.1　实验虫源

本实验使用的柑桔木虱采自广西、广东柑桔黄龙病重病区，寄主植物为柑桔和九里香。采集时将柑桔木虱连同嫩梢一起采摘回实验室，置于冰箱速冻保存供试。柑桔木虱是否携带黄龙病菌按照 Wang 等(2006)的方法以实时荧光 PCR 检测确定。

1.2　亚洲柑桔木虱总 DNA 的提取

提取 DNA 前，先将柑桔木虱用 75% 酒精浸泡 1 min, 2% NaClO 消毒 30 s，用无菌水清洗 5 遍，将最后一次清洗的无菌水用作 PCR 对照，以排除体外细菌及 DNA 干扰。处理后的柑桔木虱用细菌 DNA 提取试剂盒(Axygen 公司产品)提取总 DNA，核酸蛋白检测仪测定 DNA 浓度。

表 1 柑桔木虱样品采集信息

Table 1 Collecting data of citrus psyllids

样品编号 Sample code	采集地点 Collecting locality	经纬度(°) Longitude and latitude	采集时间 Collecting date	寄主植物 Host plant	数量(头) Number of psyllids
BH	广西合浦	N21/E109	2008.03	九里香 *Murraya paniculata*	100
	Hepu, Guangxi			甜橙 *Citrus sinensis*	100
LZ	广西柳州	N24/E109	2008.03	九里香 *M. paniculata*	100
	Liuzhou, Guangxi			甜橙 *C. sinensis*	100
YC	广东阳春	N22/E111	2008.05	九里香 *M. paniculata*	100
	Yangchun, Guangdong			马水桔 *C. reticulata*	100
GL	广西桂林	N22/E114	2008.04	九里香 *M. paniculata*	100
	Guilin, Guangxi				

1.3 PCR-RFLP 分析柑桔木虱内菌群多样性

1.3.1 16S rDNA 全长 PCR 扩增：以所获得的柑桔木虱体内微生物总 DNA 作为模板，用细菌通用引物 27 F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) 和 1 492 R (5′-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3′) (Weisburg *et al.*, 1991)扩增。扩增体系包括 5 μL 10 × buffer, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.2 mmol/L 引物, 1.5 U Taq-polymerase 和 2 μL 细菌总 DNA 模板。PCR 反应为 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 55℃ 45 s, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 7 min。所得产物于 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳分离。分离条带用 DNA 纯化试剂盒纯化回收。

1.3.2 16S rDNA 克隆文库构建和 RFLP 分析：将回收的 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体中，连接反应为(10 μL)：4 μL DNA 片段，1 μL 载体，5 μL 含连接酶的缓冲液 Solution Ⅰ，16℃ 过夜，连接到 pMD19-T 载体中。将连接产物转化到大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 感受态细胞中，在 LB/Amp^r 平板上过夜培养。随机挑取克隆子，进行 PCR 检测。将阳性克隆子分别在液体 LB/Amp^r 培养基中摇瓶培养过夜。收集菌液，用质粒小量提取试剂盒 (Axygen)提取质粒。

含有目的片段的质粒分别用 *Msp* Ⅰ，*Rsa* Ⅰ 和 *Hae* Ⅲ (Promega)限制性内切酶进行酶切。20 μL 体系：2 μL 质粒溶液，0.5 μL 限制性内切酶溶液，2 μL缓冲液和 0.2 μL 牛血清白蛋白(bovineserum albumin, BSA)溶液。37℃ 温育过夜。产物用含有溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测，分析鉴别各个阳性克隆的 *Msp* Ⅰ，*Rsa* Ⅰ 和 *Hae* Ⅲ 酶切图谱类型。根据该图谱对提取的克隆子进行分型，每一种类型图谱即是一种不同的分类操作单位(operational taxonomic unit, OTU) (Moyer *et al.*, 1996)，属于同一个 OTU 的克隆选一个代表进行测序。测序结果在 GenBank 中进行序列同源性比较。

1.3.3 系统发育分析：使用 MEGA4.0 软件，采用邻近相接法(NJ)对所有来源于柑桔木虱细菌序列与部分 GenBank 中的高同源性序列，绘制柑桔内生细菌系统进化树。

1.4 PCR-DGGE 分析木虱内细菌菌群多样性

1.4.1 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增：以提取的细菌总 DNA 为模板，用细菌通用引物：P1(357 f-GC：5′-GC-clamp-CCTACGGGAGGCAGCAG-3′) 及 P2 (518 r：5′-ATTACCGCGG CTGCTGG-3′) (刘莉等, 2008)进行扩增，上游引物 P1 5′端有 40 bp GC 夹 (CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG)。PCR 采用 50 μL 反应体系，包括 5 μL 10 × buffer (TaKaRa), 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.2 mmol/L 引物, 1.5 U Taq-polymerase (TaKaRa) 和 2 μL 细菌总 DNA。反应条件为：94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 52℃ 45 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 2 min。所得产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.2 扩增产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分离和分析：上述 PCR 产物经浓缩后，采用 DGGE 分析系统进行电泳分离，浓度为 8% 的聚丙烯酰胺 (37.5: 1, W/W)，变性剂尿素与甲酰胺线性梯度范围为 35% ~50%。电泳条件为 60℃ 恒温，160 V 电压，电泳 7 h, EB 染色 15 ~ 25 min, VersaDoc 2000 凝胶成像系统观察并记录分离条带图谱，标记 DGGE 图谱中清晰的优势条带后分别切取优势条带，捣碎后加入 30 μL 已灭菌的 dd H_2O，-20℃ 浸泡过夜，离心，取上清作为模板进行第二次 PCR 扩增。第二次 PCR 所用引物为带 GC 夹的 P1/P2 引物对，PCR 反应程序同 1.4.1 所述。扩增的 PCR

产物用纯化试剂盒(Bioflux)纯化后与载体 pMD19-T 连接，转化到 *E. coli* JM109 中，用菌落 PCR 方法检测阳性克隆。阳性克隆子送上海生工生物技术公司测序。测序结果于 NCBI 上进行 Blast 比对分析。

1.4.3 数据分析：将所得序列与 GenBank 中的近似序列用软件 Clustal W 比对分析，再用 MEGA4.0 的邻近法构建系统发育树

2 结果与分析

2.1 柑桔木虱内细菌多样性的 PCR-RFLP 分析

2.1.1 16S rDNA 克隆文库的构建与筛选：成功提取到柑桔内生细菌总 DNA，直接将总 DNA 作为模板进行 PCR 扩增，得到分子量约为 1 500 bp 的相应扩增片段。将扩增的片段与 pMD19-T 载体连接转化大肠杆菌，获得柑桔木虱内生细菌多样性 16S rDNA 克隆文库。随机挑取其中 200 个克隆子进行 PCR 检验，获得 185 个阳性克隆子，阳性率为 92%。阳性克隆经过 3 种限制性酶 *Msp* Ⅰ，*Rsa* Ⅰ和 *Hae* Ⅲ酶切后产生 31 个不同的酶切图谱(图 1)。

2.1.2 PCR-RFLP 分析结果：将 PCR-RFLP 分离筛选获得的 31 个克隆的插入片段进行测序(GenBank 登录号见表 2)，并进行 BLASTn 分析显示 31 条序列主要属于变形菌门 Proteobacteria，与 6 个科的细菌序列具有较高的同源性，分别是假单胞菌科(Pseudomonadaceae)，肠杆菌科(Enterobacteriaceae)，黄单胞菌科(Xanthomonadaceae)，伯克氏菌科(Burkholderiaceae)，立克次氏体科(Rickettsiaceae)，根瘤菌科(Rhizobiaceae)。有 5 条序列与合胞体共生菌(syncytium endosymbiont)具有 99% 的同源性，且其检出率占挑取的所有阳性克隆子的 31%，可见其为木虱体内主要的优势菌群；5 条序列与 *Candidatus* Carsonella ruddii 和柑桔木虱体内的 *Mycetocyte* endosymbiont 都具有 98% 以上的同源性。有 7 条序列与 GenBank 中已登录序列仅具 92% ~99% 同源性，并且都属于不可培养菌；另外有 3 条序列与 *Pseudomonas* 属有很高同源性；与 *Ralstonia* 属同源性高的有 2 条；与 *Pantoea* 属同源性高的有 3 条序列。此外发现 *Wolbachia*，柑桔黄龙病菌 *Candidatus* Liberibacter asiaticus 等存在。详细信息见表 2。

2.1.3 系统发育分析：用邻近相接法(N-J 法)对柑桔木虱内分离鉴定的所有细菌序列以及与 GenBank 中比对得到的同源性最高的序列进行系统发育分析结果见图 2。

2.2 柑桔木虱内细菌多样性的 PCR-DGGE 分析

2.2.1 柑桔木虱内细菌总 DNA 的扩增产物的变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)图谱分析：对不同地区及不同寄主植物来源的柑桔木虱内的细菌的 16S rDNA V3 区序列的 DGGE 图谱(图 3：A)分析表明：来源于相同寄主植物但不同地区的柑桔木虱体内细菌图谱有一定的差异，来源于相同地区但不同寄主植物来源的柑桔木虱的图谱同样有差异。其中优势条带 M3-4 并不随木虱寄主的变化和地理位置的变化而改变，在柑桔木虱内稳定存在。条带 M3-5，M3-14，M3-15 和 M3-18 也在本实验中所有来源的柑桔木虱中 UPMAGA 的方法聚类比较不同寄主植物及不同地区木虱微生物分离条带的相似性(图 3：B)，可以看出，寄主为九里香的柑桔木虱体内微生

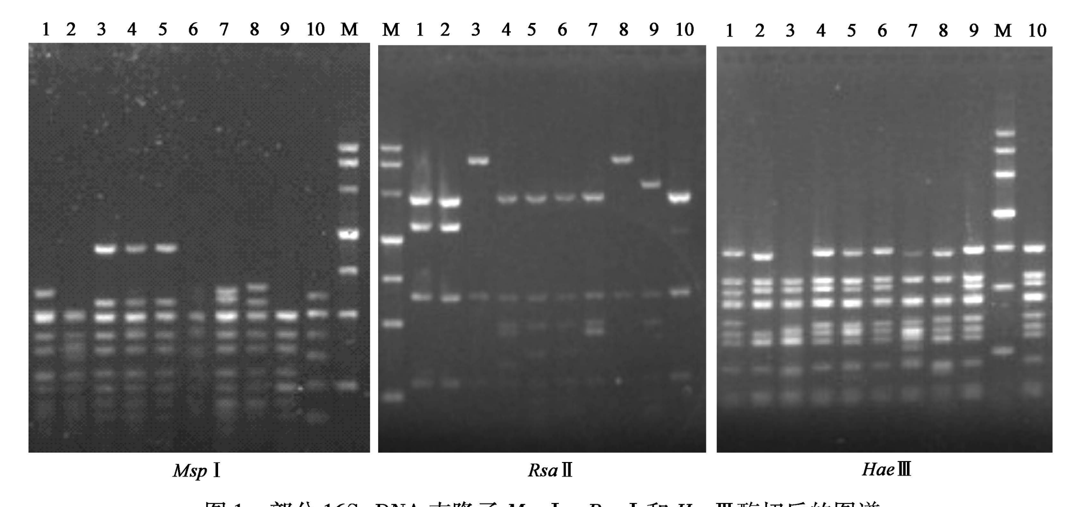


图 1　部分 16S rDNA 克隆子 *Msp* Ⅰ，*Rsa* Ⅰ和 *Hae* Ⅲ酶切后的图谱

Fig. 1　The fingerprints of 16S rDNA clones digested with enzymes *Msp* Ⅰ, *Rsa* Ⅰ and *Hae* Ⅲ

M：DNA Marker III；1 –10：随机选择的阳性克隆子 Part of positive clones randomly selected.

表 2 PCR-RFLP 操作单元的鉴定和序列分析

Table 2 Bacterial identified by PCR-RFLP and sequence analysis

操作单元 RFLP OUTs	GenBank 登录号 GenBank accession no.	GenBank 数据库中参考菌株 References in GenBank	参考菌株序列号 Reference accession no.	一致性(%) Identity
M-1	GU553043	*Pseudomonas* sp.	AM410620	99
M-2	GU553045	*Pantoea agglomerans* strain	AY924375	93
M-3	GU553044	不可培养细菌 Uncultured bacterium	EU771731	94
M-4	GU553040	不可培养细菌 Uncultured bacterium	GU225955	98
M-5	GU553019	柑橘木虱合胞内共生体 Syncytium endosymbiont of *Diaphorina citri*	EF433792	99
M-6	GU553020	不可培养细菌 Uncultured bacterium	AJ867671	91
M-7	GU553021	不可培养细菌 Uncultured bacterium	GU225955	99
M-8	GU553022	*Candidatus* Carsonella ruddii	EF450250	99
		含菌细胞内共生体 *Mycetocyte* endosymbiont	AB038367	99
M-9	GU553023	柑橘木虱合胞共生体 Syncytium endosymbiont of *D. citri*	EF433792	99
		Herbaspirillum sp.	EU090893	91
M-10	GU553024	*Candidatus* Carsonella ruddii	EF450250	99
M-11	GU553025	柑橘木虱次级共生体 Secondary symbiont of *D. citri*	EU570830	99
		不可培养草酸杆菌 Uncultured Oxalobacteraceae	EF454731	90
M-12	GU553026	*Candidatus* Carsonella ruddii	EF450250	99
M-13	GU553027	*Pseudomonas* sp.	AB480754	90
M-14	GU553028	*Ralstonia* sp.	AY043380	92
M-15	GU553029	*Pantoea agglomerans*	AY924375	99
M-16	GU553030	*Candidatus* Carsonella ruddii	EF450250	99
M-17	GU553046	不可培养细菌 Uncultured bacterium	DQ532154	99
M-18	GU553031	*Ralstonia* sp.	AY043380	95
M-19	GU553032	不可培养细菌 Uncultured bacterium	GU225955	99
M-20	GU553033	*Candidatus* Liberibacter asiaticus	FJ750457	98
M-21	GU553034	不可培养细菌 Uncultured bacterium	DQ532154	92
M-22	GU553035	*Pantoea agglomerans*	GQ451699	92
M-23	GU553039	含菌细胞内共生体 *Mycetocyte* endosymbiont	AB038367	99
M-24	GU553042	柑橘木虱合胞内共生体 Syncytium endosymbiont of *D. citri*	EF433792	99
M-25	GU553036	*Stenotrophomonas* sp.	AY689032	93
		Xanthomonas retroflexus	DQ337602	92
M-26	GU553037	柑橘木虱合胞内共生体 Syncytium endosymbiont *D. citri*	EF433792	99
M-27	GU553038	*Candidatus* Carsonella ruddii	EF450250	99
M-28	GU553041	*Pseudomonas fulva*	AM411071	99
M-29	GU553047	*Wolbachia* endosymbiont	GU124506	98
M-30	GU553048	*Serratia marcescens*	FJ853424	93
M-31	GU553049	*Pantoea agglomerans* strain	AY924375	94

物在聚类树上大多聚在一支，而柑桔上采集的柑桔木虱体内微生物聚在另一支，表明寄主和地理位置两个因素相比，寄主的差异对柑桔木虱内细菌群落构成的影响大于地理位置的不同对柑桔木虱内细菌群落的影响。

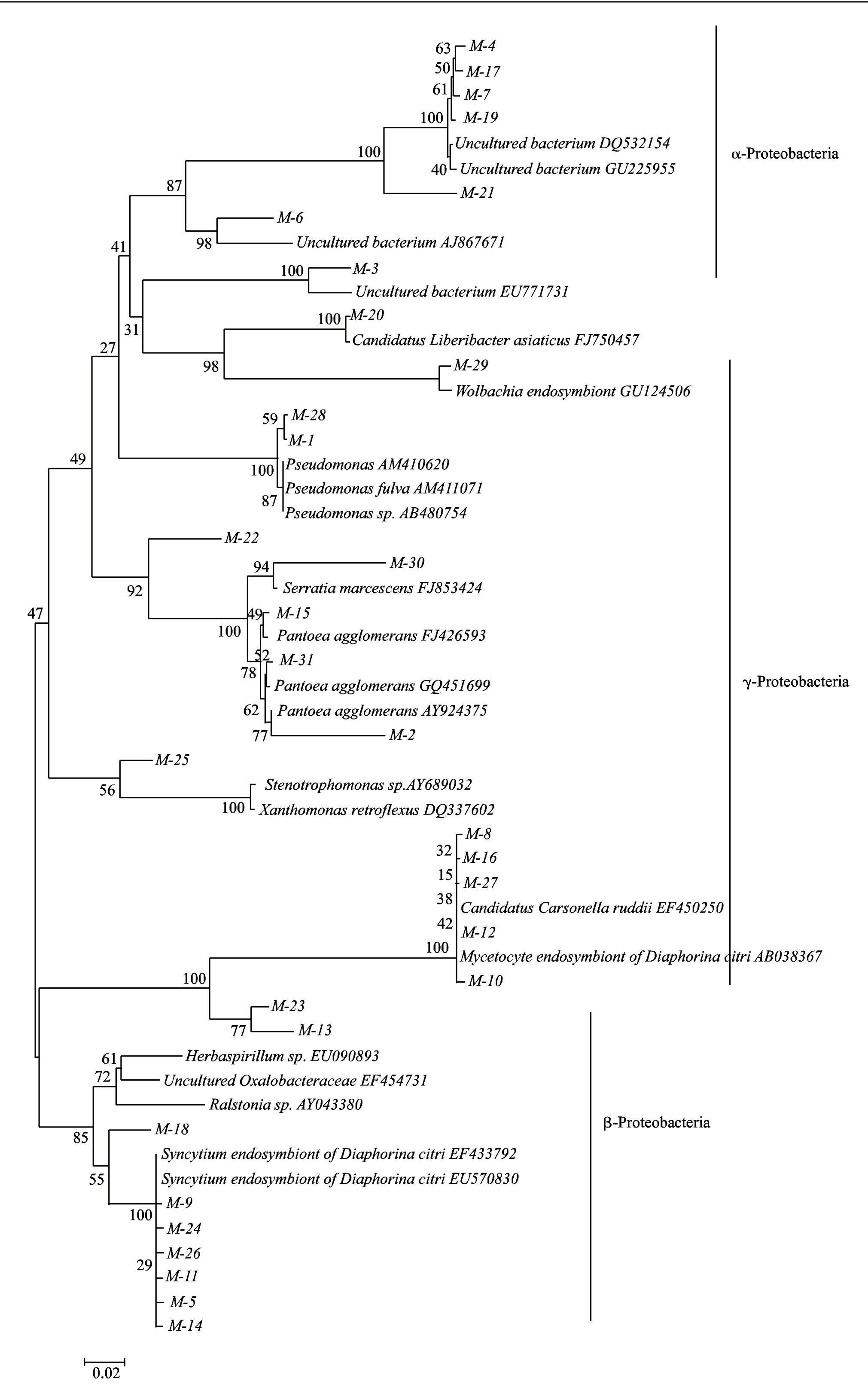


图 2　基于 16S rDNA 序列构建的柑桔木虱内生菌进化树（N-J 法）

Fig. 2　A phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of bacteria in *Diaphorina citri* by Neighbor-Joining method

分支点上的数值为支持率 Numbers at nodes indicate bootstrap values for each node out of 100 bootstrap replicates；标尺 0.02 为进化距离 Scale 0.02 means evolutional distance.

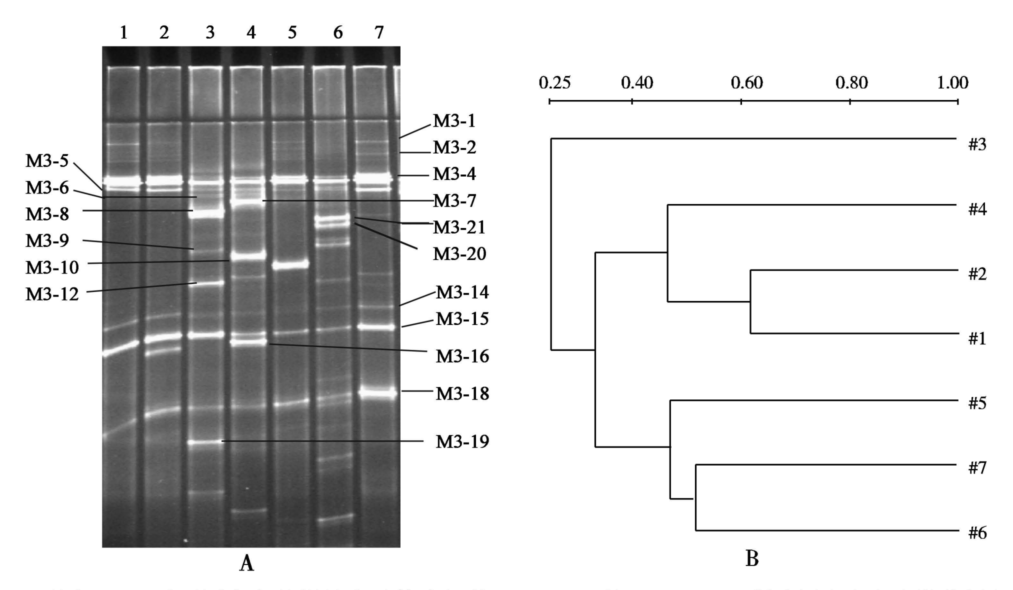


图 3 不同地区以及不同寄主的柑桔木虱体内细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE 凝胶图(A)和聚类分析(B)

Fig. 3 DGGE profiles (A) and the cluster dendrogram analysis (B) based on 16S rDNA of *Diaphorina citri* endosymbiont from different areas and host plants

#1 -4: 九里香, 分别来自桂林、柳州、合浦和阳春 *Murraya paniculata* from Guilin, Liuzhou, Hepu and Yangchun, respectively; #5 -7: 柑桔, 分别来自阳春、合浦和柳州 Citrus from Yangchun, Hepu and Liuzhou, respectively.

2.2.2 柑桔木虱内细菌序列比对与系统发育分析: 将 DGGE 分离获得的条带测序并与 GenBank 中数据比对结果如表 3, 数据显示根据 16S rDNA-DGGE 分离获得的柑桔木虱内细菌主要属于变形菌门(Proteobacteria), 包括 4 个科, 分别是假单胞菌科(Pseudomonadaceae), 立克次氏体科(Rickettsiaceae), 肠杆菌科(Enterobacteriaceae), 黄单胞菌科(Xanthomonadaceae), 此外还有厚壁菌门(Firmicutes)的葡萄球菌科(Staphylococcaceae)和芽孢杆菌科(Bacillaceae)。结合表 3 和 4 结果可以看出, 合胞体共生菌在柑桔木虱体内稳定存在, 不随柑桔木虱寄主和地理位置的改变而发生变化, 是柑桔木虱内占主要优势的共生菌。共生菌 *Wolbachia* 也在各地柑桔木虱体内稳定检出, 表明中国柑桔木虱感染 *Wolbachia* 是普遍现象。泛菌属 *Pantoea* 在几个木虱样品体内检出率也较高, 为次优势种群。*Bacillus* sp. 在几个样品中均能检测出, 但丰度变化较大。其余的细菌只在部分样品中存在, 受到柑桔木虱的寄主植物及地理位置的影响, 可能为过路临时菌群。

3 讨论

本研究采用 16S rDNA 的 PCR-RFLP 结合 PCR-DGGE 分析方法, 对野外采集的柑桔黄龙病的传播媒介昆虫柑桔木虱体内的细菌群落多样性进行了研究。16S rDNA 的 PCR-DGGE 图谱分析显示, 木虱体内的细菌菌群包含 Proteobacteria 4 个科的微生物以及厚壁菌门(Firmicutes)的 2 个科的微生物。柑桔木虱内细菌类群受到柑桔木虱寄主植物和地理位置的影响而存在差异, 其中寄主植物的影响比地理位置的影响更明显。16S rDNA 的 RFLP 分析获得 31 个不同的分类操作单位的细菌类群序列, 包括 *Pseudomonas* sp., *Pantoea* sp., *Wolbachia* sp., *Ralstonia* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Bacillus* sp., Staphylococcus sp. 以及合胞体共生菌, *Candidatus* Carsonella ruddii 等细菌菌群; 基于 16S rDNA V3 可变区基因序列的 DGGE 分析获得 21 个不同原核细菌类群, 这些都证实柑桔木虱体内共生细菌多样性较为丰富。两种方法均显示柑桔木虱内的合胞体共生菌在体内稳定存在, 不受寄主和地理位置的影响, 推测其可能是柑桔木虱的主要优势菌群。在柑桔木虱体内, 以 RFLP 方法获得的 31 个不同操作单位中合胞共生菌占 5 个, *Candidatus* Carsonella ruddii(*C. ruddii*)有 5 种, 此外还发现有含菌体(Bacteriome/Mycetocytes); 而以 DGGE 方法获得的 21 个不同菌群序列中, 合胞体共生菌有 4 种。合胞内共生体属于变形菌门的 β 亚纲(Subandiyah *et al*., 2000), 本研究中得到合胞体共生菌序列同 GenBank 中登录的日本和美国的柑桔木虱体内的合

表 3　不同样品中 DGGE 图谱的条带分布

Table 3　The bands of different samples in electrophoresis gel

条带序号 Band no.	合浦 Hepu		柳州 Liuzhou		阳春 Yangchun		桂林 Guilin
	九里香 *Murraya paniculata*	甜橙 *Citrus sinensis*	九里香 *M. paniculata*	甜橙 *C. sinensis*	九里香 *M. paniculata*	马水桔 *C. reticulata*	九里香 *M. paniculata*
M3-1	-	-	-	+	-	-	+
M3-2	-	-	-	+	-	-	-
M3-4	+	+	+	+	+	+	+
M3-5	+	+	+	+	+	+	+
M3-6	+	-	-	-	+	-	-
M3-7	-	-	-	-	+	-	-
M3-8	+	-	-	-	-	-	-
M3-9	+	-	-	-	-	-	-
M3-10	-	-	-	-	-	-	-
M3-12	+	-	-	-	-	-	-
M3-14	+	+	+	+	+	+	+
M3-15	+	+	+	+	+	+	+
M3-16	-	-	-	-	+	-	-
M3-18	+	+	+	+	+	+	+
M3-19	+	-	-	-	-	-	-
M3-20	-	+	-	+	-	-	-
M3-21	-	+	-	-	-	-	-

+：泳道中有该条带 With the band；-：泳道中无该条带 Without the band.

表 4　柑桔木虱内优势细菌 DGGE 指纹图谱对应的 NCBI 序列比对结果

Table 4　Sequences blast of 16S rDNA from bands in DGGE bacterial fingerprints

条带序号 Band no.	GenBank 登录号 GenBank accession no.	相关参考菌株 Closely identified phylogenetic relatives	一致性(%) Identity
M3-1	GU553050	Syncytium endosymbiont of *D. citri* (EF433792)	99
M3-2	GU553051	Syncytium endosymbiont of *D. citri* (EF433792)	99
M3-4	GU553052	Syncytium endosymbiont of *D. citri* (EF433792)	99
M3-5	GU553053	*Bacillus* sp. (AJ971852)	98
M3-6	GU553054	*Staphylococcus sciuri* (FJ981914)	98
M3-7	GU553055	Uncultured *Pseudomonas* sp. (EU981998)	100
		Tissierella praeacuta (X80833)	100
M3-8	GU553056	Uncultured *Pseudomonas* sp. (EU909141)	97
M3-9	GU553057	Uncultured bacterium (GQ078953)	99
M3-10	GU553058	Enterobacteriaceae bacterium (AB461801)	100
M3-12	GU553059	*Pseudomonas putida* (FJ204928)	100
M3-14	GU553060	*Wolbachia* (GU236955)	98
M3-15	GU553061	*Pantoea* sp. (GQ451699)	98
M3-16	GU553062	*Pantoea* sp. (FJ756349)	98
M3-18	GU553063	Syncytium endosymbiont of *D. citri*	98
M3-19	GU553064	*Staphylococcus sciuri* (AB523707)	100
M3-20	GU553065	*Staphylococcus* sp. (FJ866688)	100
M3-21	GU553066	*Stenotrophomonas* sp. (GQ434396)	98
		Xanthomonas sp. (GQ464377)	98

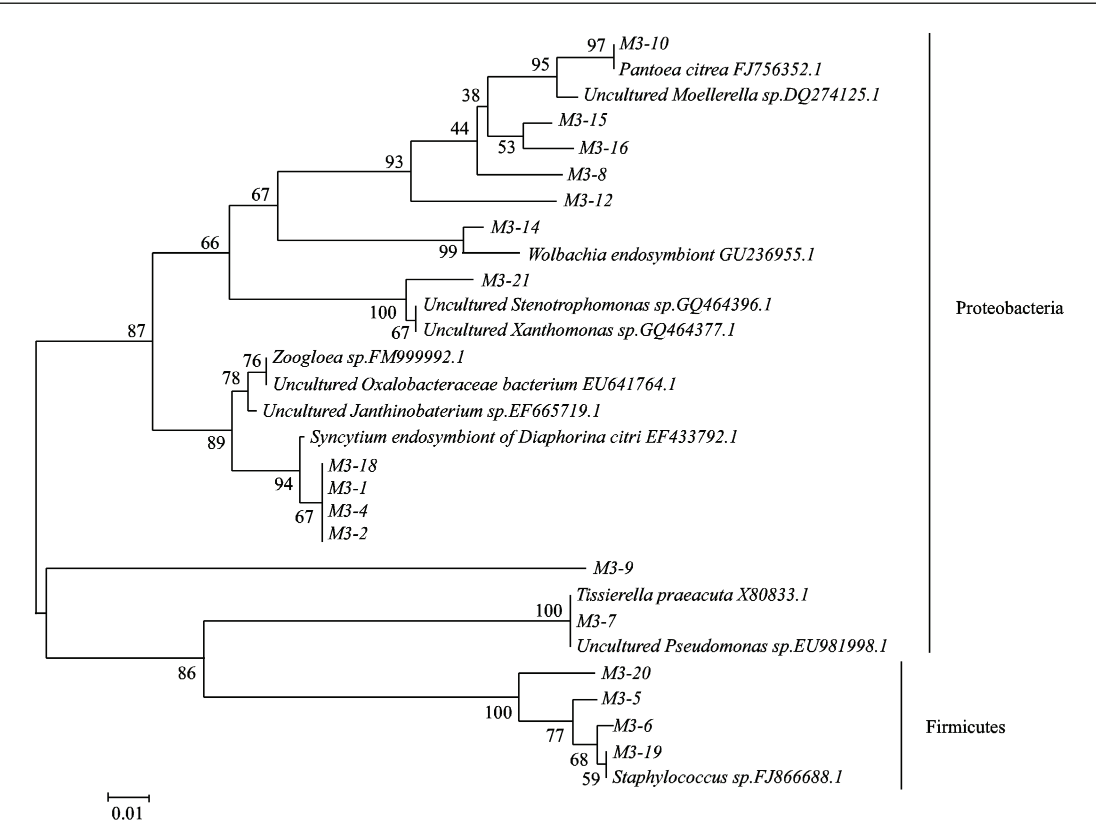


图 4 柑桔木虱体内细菌系统发育分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis for bacterial 16S rRNA sequences

分支点上的数值为支持率 Numbers at nodes indicate bootstrap values for each node out of 100 bootstrap replicates. 标尺 0.01 表示进化距离 Scale 0.01 shows the evolutional distance.

胞体共生菌（GenBank 登录号：AB038368，EF43792）同源性均为 97%，但目前对于上述合胞内共生体到底属于什么细菌，是包含多种细菌的共生体还是单一类细菌都还有待深入研究。

C. ruddiis 是存在于木虱体内的含菌体（Bacteriome/Mycetocytes），目前只在吸食韧皮部的木虱中发现，也是迄今为止报道的具有最小基因组的细菌（Thao *et al.*，2003；Thao and Baumann 2004a，2004b；Nakabachi *et al.*，2006）。本研究中发现大量 *C. ruddii* 序列，经 BLASTn 比对分析，这些 *C. ruddii* 序列与含菌内共生体 Mycetocyte endosymbiont 具有高度同源性。因此，有理由推测这些 *C. ruddii* 很可能存在于柑桔木虱的含菌体中。对蚜虫共生细菌的研究显示，在所有蚜虫的含菌细胞（Mycetocytes）中都存在的一种专性内共生细菌 *Buchnera*，它们对于蚜虫的正常生长和繁殖是必需的。蚜虫与其共生菌 *Buchnera* 已建立了密切的互利依存关系，即共生体离开寄主细胞无法存活，而蚜虫如果去除其共生菌也将不育或死亡（Ohtaka and Ishikawa，1991）。但 *C. ruddii* 是否和蚜虫 *Buchnera* 一样可以为宿主提供多种必需氨基酸，以满足韧皮杆菌的内在营养需要，还有待证实。现有证据表明，柑桔黄龙病菌因长期寄生在柑桔韧皮部组织中，已经不需自行合成某些氨基酸（Yongping Duan，私人通讯）。因而，深入开展韧皮杆菌与这类共生菌的研究，可能将有助于揭示二者之间的相互作用及内在联系。

共生菌 *Wolbachia* 对多种宿主具有特殊生殖调控的作用，它可以改变宿主的生殖行为，导致细胞质不亲和（cytoplasmic incompatibility，CI）、诱导雌性化（feminization）和孤雌生殖（part henogenesis inducing，PI）、杀雄（male killing）等现象，并能够垂直传递下去（Markus and O'Neill 2006）。由于 *Wolbachia* 对宿主的特殊生殖调控作用，近年来已引起人们的极大兴趣，越来越多的昆虫被发现与 *Wolbachia* 共生。有不少学者提出利用 *Wolbachia* 侵染害虫，使得寄主生殖力降低来控制甚至消灭对农业生产及人类健康有重要影响的害虫（Sinkins *et al.*，1995）。重庆大学基因工程中心采用 16S rDNA，*ftsZ* 和 *wsp* 基因的系统发育分析证实我国柑桔木虱

体内大量存在内共生菌 *Wolbachia*，检出率高达 100%，属于 B 组的 Con 亚组（王中康等，2010）。但 *Wolbachia* 是否对柑桔木虱具有类似的生殖调控作用尚需要进一步研究。

在昆虫肠道内的微生物可分为常驻菌群和过路菌群，常驻菌群增殖的速度至少要相当于或者超过肠道对它的排出速率，才可能在肠道中能稳定检出。许多伴随昆虫完成整个生活周期的肠道细菌属于次级共生体，它们可能是寄生性的，抑或是互利共生。互利共生的肠道细菌能为宿主提供营养或降解有毒化合物，从而使带有这些共生菌的宿主在种群中占据优势（Campbell，1989）。例如白蚁和蟑螂就依赖兼性互利共生菌在其后肠帮助消化。殷幼平等从贡嘎蝠蛾 *Hepialus gonggaensis* 幼虫肠道中分离到一株优势共生菌 *Carnobacterium* sp.，将其通过食物回接到室内饲养的贡嘎蝠蛾幼虫可以显著地促进该虫的生长发育并提高存活率（Yin *et al.*，2011）。过路菌群受到环境的影响比较大（刘莉等，2008；相辉和黄勇平，2008）。李正西和李定旭（2005）研究桃蚜 *Myzus persicae*（Sulzer）自然种群体内共生菌时发现有次级共生菌——泛菌类（*Pantoea*）。本研究从柑桔木虱中也发现了大量的植源性机会致病菌——成团泛菌 *Pantoea agglomerans*，它们在柑桔木虱体内的分布及其作用亦值得进一步研究。

从体内细菌 16S rDNA 的 DGGE 图谱分析发现，柑桔木虱寄主植物的不同和地理位置的差异，木虱体内细菌群落也出现差异。那些并不稳定存在，表现出差异的细菌可能来源于环境当中，并未与寄主之间形成真正的共生关系，属于过路菌群。但是考虑到 PCR-DGGE 在回收分离条带时只能回收明显条带即高丰度菌群条带，某些细菌类群（包括一些常驻菌）可能由于丰度低而没被检测到，从而使菌群多样性被低估（PCR-DGGE 得到的肠道菌群多样性较 PCR-RFLP 得到的多样性低也可能与此有关）。两种方法比较可以看出体内细菌菌群的多样性和同一种细菌菌群的丰度在不同寄主和不同地域来源的木虱中是有差异的。

从系统发育上看，在柑桔木虱体内存在的合胞体共生菌属于变形菌门 β-亚纲，*Candidatus* Carsonella ruddii 属于 γ-亚纲，*Wolbachia* 属于 α-亚纲。其中 *Wolbachia* 与韧皮杆菌的亲缘关系比其他几种共生细菌与韧皮杆菌更近。在柑桔木虱体内存在的这些共生细菌与柑桔黄龙病菌之间长期协同进化基础上形成的生态学上的种种联系和相互作用，是否对黄龙病菌在木虱体内的转移、生存和增殖产生影响，还需要有模拟原生态的共培养试验的直接或间接证据来佐证。

参 考 文 献（References）

Baumann P, Baumann L, Lai CY, Rouhbakhsh D, Moran NA, Clark MA, 1995. Genetics, physiology and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49: 55 – 94.

Birkle LM, Minto LB, Douglas AE, 2002. Relating genotype and phenotype for tryptophan synthesis in an aphid-bacterial symbiosis. *Physiological Entomology*, 27: 1 – 5.

Brummel T, Ching A, Seroude L, Simon AF, Benzer S, 2004. *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(35): 12974 – 12979.

Campbell BC, 1989. On the role of microbial symbiotes in herbivorous insects. In: Bernays E ed. Insect Plant Interactions. CRC Press, Boca Raton. 1 – 44.

Dillon RJ, Charnley AK, 2002. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Research in Microbiology*, 153(8): 503 – 509.

Dillon RJ, Vennard CT, Charnley AK, 2002. A note: Gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone. *J. Appl. Microbiol.*, 92: 759 – 763.

Dixon FG, 1998. Aphid Ecology. Chapman & Hall, London.

Douglas AE, 1989. Mycetocyte symbiosis in insects. *Biol. Rev.*, 64: 409 – 434.

Douglas AE, 2006. Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. *J. Exp. Bot.*, 57(4): 747 – 754.

Li ZX, Li DX, 2005. Molecular identification of the primary and secondary symbionts of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Acta Entomologica Sinica*, 48(5): 810 – 814. [李正西，李定旭，2005. 桃蚜自然种群初级和次级共生菌的分子鉴定. 昆虫学报，48(5): 810 – 814]

Liu L, Wang ZK, Yu HW, Chen SJ, Yan GF, Xia YX, Yin YP, 2008. Analysis of the bacterial diversity in intestines of *Hepialus gonggaensis* larvae. *Acta Microbiologica Sinica*, 48(5): 616 – 622. [刘莉，王中康，俞和伟，陈仕江，阎光凡，夏玉先，殷幼平，2008. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道细菌多样性分析. 微生物学报，48(5): 616 – 622]

Markus R, O'Neill, 2006. The genus *Wolbachia*. *Prokaryotes*, 5: 547 – 561.

Moyer CL, Tiedje JM, Dobbs FC, Karl DM, 1996. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial smallsubunit rRNA genes: Eficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(7): 2501 – 2507.

Nakabachi A, Yamashita A, Toh H, Ishikawa H, Dunbar H, Moran N, Hattori M, 2006. The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella*. *Science*, 314(5797): 267.

Ohtaka C, Ishikawa H, 1991. Effects of heat treatment on the symbiotic system of an aphid mycetocyte. *Symbiosis*, 11: 19 – 301.

Sasaki T, Kawamura M, Ishikawa H, 1996. Nitrogen recycling in the

brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: involvement of yeast-like endosymbionts in uric acid metabolism. *J. Insect Physiol.*, 42: 125 – 129.

Sinkins SP, Braig HR, O'Neill SL, 1995. *Wolbachia* superinfection and the experession of cytoplasmic incompatibility. *Proc. Roy. Soc. B*, 261: 325 – 330.

Subandiyah S, Nikoh N, Tsuyumu S, Somowiyarjo S, Fukatsu T, 2000. Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). *Zoological Science*, 17: 983 – 989.

Thao ML, Baumann P, 2004a. Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(6): 3401 – 3406.

Thao ML, Baumann P, 2004b. Evidence of multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (Sternorryncha: Aleyrodidae). *Curr. Microbiol.*, 48: 140 – 144.

Thao ML, Baumann P, Hess JM, Falk BW, Ng JCK, Gullan PJ, Baumann P, 2003. Phylogenetic evidence for two new insect associated *Chlamydia* of the family Simkaniaceae. *Curr. Microbiol.*, 47: 46 – 50.

Tokuda G, Watanabe H, Matsumoto T, Noda H, 1997. Cellulose digestion in the wood-eating higher termite *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki): distribution of cellulase and properties of endo-β-1,4-glucanase. *Zoological Science*, 14: 83 – 97.

Wang Z, Yin Y, Hu H, Yuan Q, Peng G, Xia Y, 2006. Development and application of molecular-based diagnosis for '*Candidatus* Liberibacter asiaticus', the causal pathogen of citrus huanglongbing. *Plant Pathology*, 55: 630 – 638.

Wang ZK, Tian SC, Xian JX, Chen SW, Liu TT, Yin YP, 2010. Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in the Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*) (Homoptera: Psylloidea) in populations in partial areas in China. *Acta Entomologica Sinica*, 53(9): 1045 – 1054. [王中康, 田圣超, 贤家旭, 陈世伟, 刘婷婷, 殷幼平, 2010. 中国部分地区柑桔木虱体内感染 *Wolbachia* 的检测及其系统发育分析. 昆虫学报, 53(9): 1045 – 1054]

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ, 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697 – 703.

Xiang H, Huang YP, 2008. Symbiosis between gut microbiota and insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(5): 687 – 692. [相辉, 黄勇平, 2008. 肠道微生物与昆虫的共生关系. 昆虫知识, 45(5): 687 – 692]

Yin YP, Mu DD, Chen SJ, Liu L, Wang ZK, 2011. Effects on growth and digestive enzyme activities of the *Hepialus gonggaensis* larvae caused by introducing probiotics. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 529 – 533.

(责任编辑: 袁德成)